

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08064

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能改善薬による新規腎疾患治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutics for kidney diseases by mitochondria-homing drug

研究代表者

鈴木 健弘 (Suzuki, Takehiro)

東北大学・医工学研究科・特任准教授

研究者番号：50396438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体のエネルギー産生(ATP合成)と酸化ストレスの発生源として重要なミトコンドリアの機能異常によるミトコンドリア病は確立した治療法のない難病である。我々はミトコンドリア病患者細胞でATP産生を増加させて酸化ストレスを減少し、細胞の生存率を改善するミトコンドリア特異的機能改善薬 MA-5を開発した。MA-5はミトコンドリアの構造と機能維持に重要なミトコンドリア内膜蛋白質のMitofilinと結合してATP合成酵素の重合化を促進することでATP増加と酸化ストレス減少効果を発揮し、ミトコンドリア病マウスと急性腎障害モデルマウスで心臓と腎臓のミトコンドリア機能と腎障害を改善することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction causes various mitochondrial diseases, kidney injuries and cardiomyopathy. Intracellular ATP depletion and the increasing mitochondria-derived reactive oxygen species (mitROS) are considered as major pathophysiologic mechanisms of disease progression in mitochondrial abnormalities. Recently we reported mitochondria homing drug, mitochonic acid-5 (MA-5) increased intracellular ATP, decreased mitochondrial ROS and improved cell survivals of fibroblasts from mitochondrial disease patients by binding mitochondrial protein Mitofilin and promoting oligomerization of ATP synthases MA-5 improved the renal function and tubular cell injuries in murine renal ischemia reperfusion and cisplatin induced nephropathy models. MA-5 also improved mitochondrial respiratory function in kidney and heart of mitochondrial disease model mice (mitomice).

研究分野：腎臓内科

キーワード：ミトコンドリア 酸化ストレス ATP 急性腎障害 慢性腎臓病 造影剤腎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性腎障害(AKI)と慢性腎臓病(CKD)は末期腎不全/透析導入の原因となり、心血管疾患の高率な合併により患者の高い死亡率と高額な医療費が世界的な課題である。AKIは腎臓の虚血や腎毒性物質により惹起される急性尿細管傷害が主要な病態であるが、有効な治療法は確立されていない。AKIとCKDでは尿細管傷害によるアポトーシスが機能的尿細管喪失を介して腎機能を低下させる。

多様な輸送と代謝を担う尿細管上皮は活発なミトコンドリア代謝に依存しておりAKIにおいてはミトコンドリア機能傷害がミトコンドリア由来 ROS(mtROS)蓄積とアポトーシスシグナルにより尿細管細胞死を起こす。

また糸球体濾過の選択的バリア機能を担う糸球体上皮細胞(podocyte)も豊富なミトコンドリアでATPを産生してその特殊な細胞構造と機能を維持する。

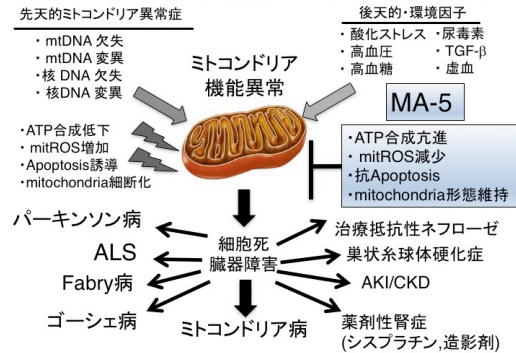
さらに治療抵抗性ネフローゼ症候群患者にミトコンドリアでの生体エネルギー産生(ATP合成)の過程で行われる酸化リン酸化(OXPHOS)の電子担体であるCoenzyme Qの合成酵素の変異が多数報告されている(PDDS2, COQ2, COQ6, ADCK4, *Int J Biochem Cell Biol*; 45:2109, 2013)。ミトコンドリアDNA(mtDNA)の変異(A3243G, tRNA^{LEU}mut)を持つミトコンドリア病のMELASでも尿細管障害(Fanconi 症候群)や糸球体上皮細胞障害と治療抵抗性ネフローゼを伴う巣状糸球体硬化症(FSGS)などの腎疾患が合併する(*Nat Rev Nephrol*;12:267, 2016)。

(2) 我々は腎不全患者体内に蓄積する物質のメタボローム解析から、ある種のインドール化合物が腎臓由来の赤血球造血ホルモンであるエリスロポイエチン(Epo)産生を誘導することを見出し、この化合物を元に新規に合成した化合物のスクリーニングから、Epo産生誘導とともに細胞内ATP増加と腎毒性物質・酸化ストレスによる細胞死を抑制する化合物#5を選抜した。化合物#5はミトコンドリア病患者由来線維芽細胞でmtROSによるアポトーシスを抑制し、虚血再灌流及びシスプラチンによるAKIモデルマウスで腎機能と腎組織傷害を改善させた。化合物#5には細胞毒性はなくmtROS産生を減少させながらATP産生を維持させており、ミトコンドリア内膜蛋白質への結合を介してミトコンドリア・細胞保護作用を発揮すミトコンドリア特異的な機序によるミトコンドリア機能改善作用が認められたため、Mitochonic acid 5 (MA-5)と名付けた。

(3) MA-5はmtROSを減少させながら細胞内ATP産生を維持し、ミトコンドリア機能異常によるアポトーシス・細胞死を抑制することから、ミトコンドリア機能障害が主要な

原因・傷害機序となる、AKI(腎虚血やシスプラチンなどの薬剤性腎障害による急性尿細管障害)や糸球体上皮細胞障害によるネフローゼ症候群やFSGS、及びCKD進行に対して有効な新規ミトコンドリア特異的腎疾患治療薬となる可能性があった(図1)。

図1 ミトコンドリア異常症へのMA-5治療介入



2. 研究の目的

本研究の目的はミトコンドリア機能障害へのMA-5の作用機序をミトコンドリア内膜・クリスタ機能蛋白質との相互作用から解明し、ミトコンドリア由来細胞死を抑制する新規の腎疾患治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞モデルを用いてMA-5のミトコンドリア内膜・クリスタ相互作用とミトコンドリア機能改善作用機序を解明する。グルタチオン合成酵素阻害薬の(L-buthionine-(S,R)-sulfoximine:BSO)による酸化ストレス誘導細胞死モデルはミトコンドリア病モデルとして治療薬のスクリーニングに用いられている。ヒト尿細管上皮由来HK2細胞は造影剤やシスプラチンの添加でミトコンドリア機能障害と酸化ストレスによる細胞障害を起こす薬剤性腎障害の培養細胞モデルとして使用する。

MA-5の細胞保護効果の検討は生存率(WST-8 assay)、細胞傷害(LDH活性 assay)、細胞内ATP定量、細胞質ROSとミトコンドリアROSの測定で評価する。

ミトコンドリア患者培養細胞や培養細胞疾患モデルの障害ミトコンドリアで認められる形態や細胞内ミトコンドリアの動態変化(Mitochondrial Dynamics)の異常に対するMA-5の治療効果はMitRed染色を用いた高解像度共焦点蛍光顕微鏡によるミトコンドリア形態(面積、ネットワーク構造)の定量評価、Time Lapsによる経時的動態変化の定量評価、電顕標本での超微細形態の定量評価などにより検討する。

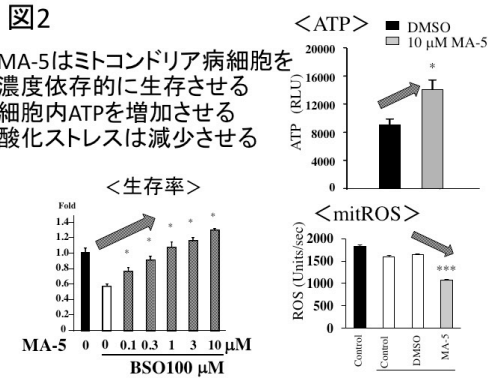
(2) MA-5による腎保護効果の評価をマウス虚血再灌流モデル、シスプラチンモデル、mitDNA欠損モデル(Mitomice:ミトコンドリア病モデルマウス)、造影剤腎症で行い各種腎疾患での有効性とin vivoでのメカニズムの検討を行う。

臓器障害保護効果の評価として腎臓は腎機能(BUN, Cr)、組織評価(PAS, EM染色による細胞壊死、線維化評価とAKIマーカーのKIM-1染色)、尿細管上皮再生は細胞周期マーカーKi67の免疫染色で行う。尿中バイオマーカーとして尿アルブミンと尿中NGAL(AKIバイオマーカー)を用いる。

疾患モデルの臓器ミトコンドリア機能障害に対する治療効果は、心腎組織のミトコンドリア呼吸能：チトクロムC Oxidase 活性化染色(C-IVの酵素活性)を行う。

4. 研究成果

(1)MA-5はミトコンドリア内膜の蛋白質mitofilinに結合することで高いミトコンドリア特異性を持ち、ATP合成酵素の重合化を促進してミトコンドリア病患者細胞のミトコンドリアにおいて、ミトコンドリアROSを減少させながらATP産生を増加させて細胞の生存率を改善する(図2, Suzuki T. *Tohoku J Exp Med(TJEM)*; 236 :225-232, 2015, Suzuki T. *J Am Soc Nephrol (JASN)*; 27:1925-1932, 2016)。



(2)MA-5はAKIモデルであるマウス虚血再灌流モデルとシスプラチン腎症モデルでも50mg/kg体重/日の経口投与で腎機能(血清CR, BUN)と急性尿細管壊死(ATN)の改善を認め(図3. Suzuki T. *JASN* 2016)、ミトコンドリア病マウス(Mitomice, ミトコンドリア病/MELASのミトコンドリアDNA変異)への長期投与でも心臓と腎臓のミトコンドリア呼吸機能を改善し短命なモデルマウスの寿命延長効果を認めた(図4. Suzuki T. *JASN* 2016)

図3 虚血再灌流(IRI) Cr, 急性尿細管壊死(ATN)スコア

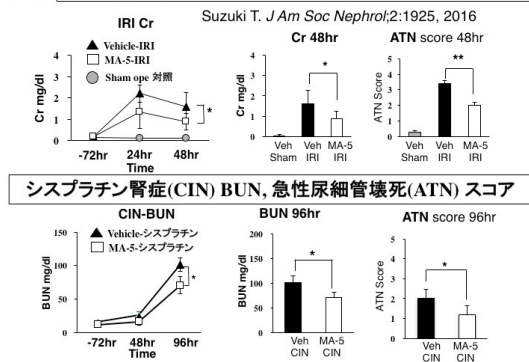
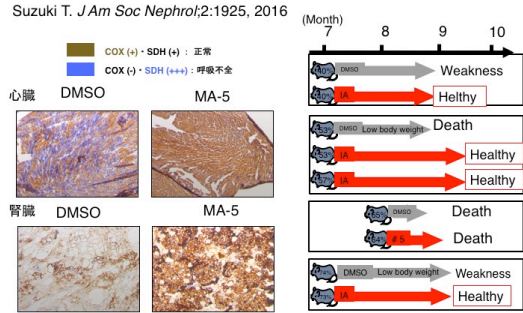
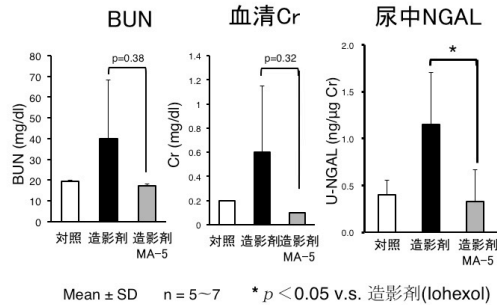


図4 MA-5はMitomiceの組織の呼吸を復活させ生命予後を改善させる



(3)臨床でのX線造影検査で用いられる造影剤の副作用として起こる造影剤腎症は最も頻度の高い薬剤性腎障害の1つであるが、その治療法は確立されていない。造影剤投与後の腎虚血と尿細管上皮細胞への直接毒性があり、ミトコンドリア障害がその病態機序にあるとされている。実際に臨床で用いられる造影剤のIohexolを2g iode/kg体重で静注投与した片腎摘マウスの急性造影剤腎症モデルにMA-5を50mg/kg体重/日で経口投与してから24時間の評価では、腎機能と尿細管病理所見の改善傾向と尿中AKIマーカーのNGALの有意な減少を認めた(図5, ISN Frontiers Meetings on Kidney Disease & Cardiovascular Disease 2018, Kidney week 2017, Kidney week 2016,第60回日本腎臓学会学術集会で発表)。

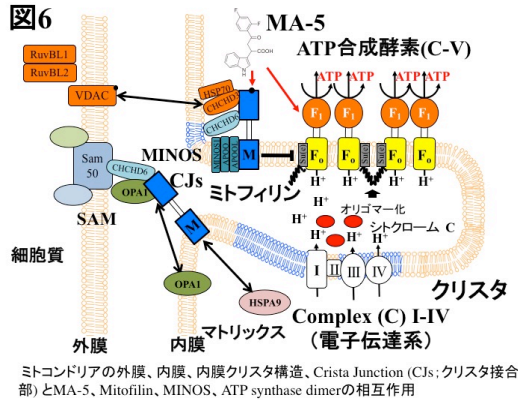
図5 MA-5はマウス造影剤腎症で腎機能を改善し尿中AKIマーカーNGALを低下させる



(4)ミトコンドリアは内膜と外膜の二重膜構造を持ち、内膜がくびれてクリスタ構造を形成し、クリスタ構造の根元の部分がcrista junctions (CJs)である。酸化的リン酸化の駆動力となる内膜を介したプロトン濃度勾配を作り出す呼吸鎖電子伝達系蛋白質複合体Complex (C) I~IVとATP合成酵素(ATP synthase, C-V)、ATP/ADPキャリアーなどのATP合成蛋白質群がクリスタに集積することで効率的にATPが合成される。

電子伝達系から発生するmtROSは抗酸化システム(SOD2, GSH, UCP2など)で除去され、CJsは電子担体のチトクロムCをクリスタ内に隔離することで電子伝達を促進し、チトクロムCの細胞質漏出によるapoptosis

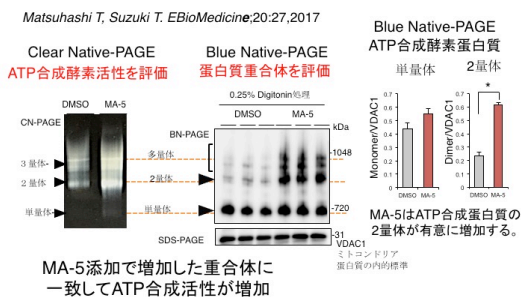
signalを防ぐ。このため、ATP合成酵素の重合化はATP合成蛋白質群の集約による協奏効果とクリスタの維持によりATP産生を促進して細胞を生存させる(図6)。



我々はMA-5がミトコンドリア内膜クリスタ構造のcrista junctions(CJs)に存在するMINOS (mitochondrial inner membrane organizing system)の構成蛋白質でミトコンドリアの機能と形態維持に必須の蛋白質であるmitofilinに結合することをMA-5結合ビーズによる結合蛋白質の単離/解析とmitofilin組換え蛋白質とMA-5との結合実験で明らかとした。さらにMA-5がミトコンドリア内膜に局在することを、MA-5蛍光標識体による培養細胞の共焦点蛍光顕微鏡観察で確認した(Suzuki T. *JASN* 2016)。

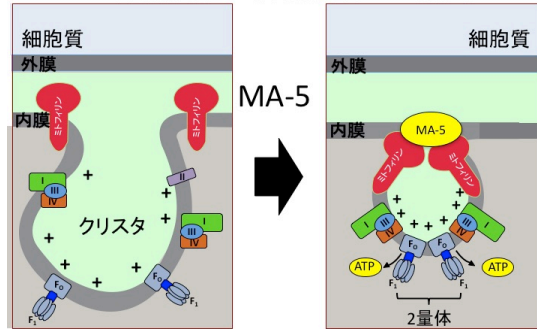
(5)ミトコンドリアでのATP合成酵素の活性と蛋白質相互作用へのMA-5作用を明らかとするため、ウシ心臓からの単離ミトコンドリアを用いて、蛋白質を変性させずにその重合体や酵素活性を評価できる電気泳動法であるBlue-Native-PAGE法とClear-Native-PAGE法を用いた検討を行った。MA-5添加によりミトコンドリア内膜に存在するATP合成酵素はその単量体の重合化が促進されて、2量体から多量体が増加し、ATP合成活性が増加することが明らかとなった(図7)。
Matsuhashi T, Suzuki T. *EBioMedicine*;20:27-38, 2017

図7 MA-5はATP合成酵素の重合化を促進し、2量体、多量体を増加させATP合成を促進する



(6)ミトコンドリア患者培養細胞ではミトコンドリアは細断化して正常なミトコンドリアの形態やDynamicsを失うことでも機能障害を来す。申請者らはMA-5の投与により、ミトコンドリア病患者細胞のミトコンドリア細断化とDynamicsの異常が改善することを電子顕微鏡と高解像度共焦点蛍光顕微鏡のTime lapsで定量的に評価して報告した(*EBioMedicine* 2017)。

図8 MA-5はMitofilinと結合する事でATP合成酵素の重合を促進しATPを作る



以上の研究成果から我々はミトコンドリア内膜の蛋白質mitofilinに結合することで高いミトコドリア特異性を持ち、ATP合成酵素の重合化を促進してミトコンドリア病患者細胞のミトコンドリアにおいて、ミトコンドリアROSを減少させながらATP産生を増加させて細胞の生存率を改善する新規のミトコンドリア特異的な機能改善薬MA-5を開発した(図1, 図6, 図8. Suzuki T. *TJEM* 2015, *JASN* 2016, *EBioMedicine* 2017)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- ① 鈴木健弘、阿部高明、ミトコンドリアをターゲットとした腎臓病治療、腎と骨代謝;31:67-84, 2018. 査読無
- ② Matsuhashi T, Sato T, Kanno S, Suzuki T (41人中4番目). Mitochondrial Acid 5 (MA-5) facilitates ATP synthase oligomerization and cell survival in various mitochondrial diseases. *EBioMedicine*;20:27-38, 2017. 査読有、doi:10.1016/j.ebiom.2017.05.016
- ③ Shima H, Sasaki K, Suzuki T (25人中3番目). A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF- α and TGF- β 1. *Sci Rep*.;7:1884,2017. 査読有 Doi:10.1038/s41598-017-01702-7

- ④Mishima E, Fukuda S, Mukawa C, (18人中14番). Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int* ;92:634-645, 2017. 査読有、doi:10.1016/j.kint.2017.02.011
- ⑤Mishima E, Fukuda S, Kanemitsu Y, (20人中16番). Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota-composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017. Nov 22:ajprenal003142017. 査読有、doi:10.1152/ajprenal.00314.2017.
- ⑥鈴木健弘、阿部高明、ミトコンドリア病の治療と心疾、患循環内科;82:375-384, 2017. 査読無
- ⑦鈴木健弘、阿部高明、ミトコンドリア機能改善薬 MA-5 によるミトコンドリア病の治療、医学のあゆみ;260:98-104, 2017. 査読無
- ⑧Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, (41人中1番目). Mitochondria binds to Mitochondria and ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol*; 27:1925-1932,2016. 査読有、doi:10.1681/asn.2015060623
- ⑨鈴木健弘、阿部高明、尿毒症とトランスポーター、腎臓内科・泌尿器;4:16937-16943, 2016. 査読無
- ⑩鈴木健弘、三島英換、三枝大輔、阿部高明 腎臓のバイオマーカーと創薬戦略、実験医学;34:1262-1269, 2016. 査読無
- ⑪鈴木健弘、阿部高明、腎性貧血治療の新たな展開、腎・高血圧の最新治療;5:74-79, 2016. 査読無
- ⑫Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, (30人中1番目). Mitochondria binds to Mitochondria and ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage. *J Am Soc Nephrol* ; 26 :1784-1794:2015. 査読有、doi:10.1681/asn.2014060530
〔学会発表〕(計14件)
- ① Takehiro Suzuki. Mitochondria homing drug MA-5 protect against contrast induced acute kidney injury. ISN Frontiers Meetings on Kidney Disease & Cardiovascular Disease 2018, Tokyo, 23 February 2018
- ② Takehiro Suzuki. Mitochondria homing drug MA-5 protect against contrast induced acute kidney injury. *Kidney week 2017, ASN, New Orleans*, 2 November 2017
- ③ Takehiro Suzuki. New therapeutics for mitochondrial diseases by mitochondria-homing drug MA-5. *Mitochondrial Medicine 2017, Washington, DC*, 28 June 2017
- ④鈴木健弘、ミトコンドリア病の新規治療薬 Mitochondria homing drug MA-5 の造影剤腎症治療効果の検討、第60回日本腎臓学会学術集会、平成29年5月28日
- ⑤松橋徹郎、鈴木健弘(共同演者)、ミトコンドリア病新規治療薬 Mitochondria homing drug MA-5 は腎障害を有するミトコンドリア病患者に対する新規治療薬となる、第60回日本腎臓学会学術集会、平成29年5月28日
- ⑥鈴木健弘(招待講演)、シンポジウム7 「ミトコンドリア・メディシン」5.ミトコンドリア創薬、第60回日本腎臓学会学術集会、平成29年5月27日
- ⑦島久登、鈴木健弘(共同演者)、抗 TNF- α 作用と抗 TGF- β 1 作用を有する新規抗線維化薬 Mitochondria homing drug MA-35 (MA-35) の開発、第60回日本腎臓学会学術集会、平成29年5月27日
- ⑧鈴木健弘(招待講演)、シンポジウム 「ミトコンドリアサイエンスと医学をつなぐ新技術・鍵分子」ミトコンドリア機能改善薬 MA-5 によるミトコンドリア異常症の治療、第39回日本分子生物学会年会 平成28年12月2日
- ⑨Takehiro Suzuki. Indole analogs MA-5 protect against contrast-induced renal injury. *Kidney week 2016, ASN, Chicago*, 19 November 2016
- ⑩向山靖乃、鈴木健弘(共同演者)、Mitochondria homing drug MA-5 binds to mitochondria and ameliorates mitochondrial disease cardiac myocyte damage、第80回日本循環器学会学術総会、平成28年3月18日
- ⑪Takehiro Suzuki. Indole analogs have novel therapeutic effects on mitochondrial diseases and kidney injury *Kidney week 2015, ASN, San Diego Convention Center, San Diego*, 6 November 2015
- ⑫鈴木健弘(招待講演)、ミトコンドリア機能改善薬による臓器保護、第33回内分代謝学サマーセミナー、平成27年7月11日
- ⑬Tetsuro Matsushashi, Takehiro Suzuki (Co-Author). Indole 3-acetic acid analog mitochondria homing drug MA-5 have novel therapeutic effects on fibroblasts from patients with Leigh, MELAS, Leber and Kearns-Sayre syndrome. *Mitochondrial Medicine 2015: Washington, DC*, 19 June 2015
- ⑭Kosuke Suzuki, Takehiro Suzuki (Co-Author). Indole derivative mitochondria homing drug MA-5 protect

cell death of skin fibroblasts from patient with Kearns-Sayre Syndrome (KSS) independent of oxidative phosphorylation or glycolytic pathway. Mitochondrial Medicine 2015: Washington, DC, 19 June 2015

〔図書〕（計 2 件）

- ①鈴木健弘、阿部高明、羊土社 レドックス疾患学、酸化ストレスと腎障害 実験医学 Vol. 36. No. 5 (増刊) 2018, pp189-194. ISBN 978-4-7581-0369-5
- ②Suzuki T, Abe T. Springer, Koibuchi N, Yen PM. (Eds.) Contemporary Clinical Neuroscience, Thyroid Hormone Disruption and Neurodevelopment, Deficit in Thyroid Hormone Transporters and Brain Development 2016, pp169-pp182. ISBN 978-1-4939-3737-0

〔その他〕

ホームページ等

東北大学医学系研究科 若手研究者の独創的研究シーズの発展を目指した医学研究シーディング・プログラム

<http://www.seeding.med.tohoku.ac.jp/index.php>

東北大学医学系研究科 腎・高血圧・内分泌学分野

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木健弘 (SUZUKI, Takehiro)

東北大学・大学院医工学研究科・特任准教授

研究者番号：50396438